

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

**(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro**



**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Juli 2004 (15.07.2004)**

PCT

**(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/058998 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/004217

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Dezember 2003 (19.12.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 61 529.2 23. Dezember 2002 (23.12.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INDIVUMED GmbH [DE/DE]; Orchideensteg 14, 22297 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JUHL, Hartmut [DE/DE]; Kurt-Küchler-Strasse 5, 22609 Hamburg (DE).

(74) Anwälte: WALCHER, Armin usw.; Louis, Pöhlau, Lohrentz, Postfach 3055, 90014 Nürnberg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE PREPARATION OF A COLLECTION OF BIOLOGICAL SAMPLE MATERIAL, AND SAMPLE COLLECTION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERSTELLUNG EINER SAMMLUNG VON BIOLOGISCHEM PROBENMATERIAL UND PROBENSAMMLUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for preparing a collection of isolated biological sample material, according to which isolated biological sample material is preserved within a defined period of time following isolation of the sample material from the natural environment thereof and is then stored, the defined period of time between the isolation and preservation of different sample materials having a defined maximum deviation. The invention also relates to a collection of biological sample material.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von isoliertem biologischen Probenmaterial, wobei isoliertes biologisches Probenmaterial innerhalb eines definierten Zeitraums nach Isolation des Probenmaterials aus seiner natürlichen Umgebung konserviert und nachfolgend gelagert wird und wobei der definierte Zeitraum zwischen Isolation und Konservierung verschiedener Probenmaterialien eine definierte maximale Abweichung aufweist. Des weiteren betrifft die Erfindung eine Sammlung von biologischem Probenmaterial.

WO 2004/058998 A1

5

Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von biologischem Probenmaterial und Probensammlung

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von biologischem Probenmaterial sowie eine Probensammlung aus isoliertem biologischen Probenmaterial.

15

Aus zahlreichen Veröffentlichungen, beispielsweise Alon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Bd. 96 (1999) 6745-6750; Zou et al., Oncogene 21 (2002) 4855-4862; Nottermann et al., Cancer Research 61 (2001) 3124-3130, Sorlie et al., PNAS 98 (2001) 10869-10874, ist bekannt, daß isolierte biologische Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei etwa -170°C oder -80°C gelagert werden können.

20

Bei diesen bekannten Verfahren ist nachteilig, daß die biologischen Gewebeproben nicht unter standardisierten Bedingungen isoliert, aufbereitet, konserviert und gelagert werden. Aufgrund der fehlenden Standardisierung sind experimentelle Ergebnisse, die bei Experimenten mit verschiedenen isolierten biologischen Proben erhalten werden, untereinander nicht ausreichend vergleichbar.

25

Die zwischen Isolation von biologischem Probenmaterial aus seiner natürlichen Umgebung und Konservierung oder Einfrieren des biologischen Probenmaterials verstreichende Zeit hat einen wesentlichen Einfluß auf den biochemischen Zustand bzw. die Qualität des isolierten biologischen Probenmaterials.

Das einem Menschen entnommene biologische Probenmaterial, beispielsweise Tumormaterial, verändert sich aufgrund der fehlenden Nährstoffversorgung durch

30

35

den Blutkreislauf. Beispielsweise kommt es zu einem Abbau von Nukleinsäuren, insbesondere Ribonukleinsäuren, sowie von Proteinen. Auch kann es zu einer Modifizierung, beispielsweise zu Phosphorylierung und/oder Dephosphorylierung von zellulären Bestandteilen, insbesondere von Proteinen, kommen.

5

Das heißt, mit zunehmender Zeitdauer nach Isolation des biologischen Probenmaterials gibt das isolierte biologische Probenmaterial nicht mehr den biochemischen oder physiologischen Zustand vor der Entnahme aus der natürlichen Umgebung wieder.

10

Um bei experimentellen in vitro-Untersuchungen mit isoliertem biologischen Probenmaterial zu Ergebnissen zu kommen, die eine Aussage über die biochemischen, physiologischen und/oder molekularbiologischen in vivo-Verhältnisse zu lassen, ist wesentlich, daß das isolierte biologische Probenmaterial auch die in vivo-Verhältnisse wiedergibt.

15

Ein solches isoliertes biologisches Probenmaterial wäre beispielsweise ein wertvolles Untersuchungsmaterial bei der Wirkstoff- und Arzneimittelentwicklung auf dem Gebiet von Krebs- oder Stoffwechselerkrankungen.

20

Des weiteren wäre ein solches hochwertiges biologisches Probenmaterial auch sehr gut geeignet, um die molekularbiologischen und/oder pathobiochemischen Vorgänge in pathologischem biologischen Probenmaterial im Vergleich zu nichtpathologischem biologischen Probenmaterial zu untersuchen, um Erkenntnisse über die molekularen

25

Ursachen von Erkrankungen, beispielsweise von Krebs- oder Stoffwechselerkrankungen, zu gewinnen.

30

Um die Relevanz von erhaltenen experimentellen Ergebnissen beurteilen zu können, müssen diese statistisch abgesichert sein. Insofern muß eine entsprechende Anzahl von experimentellen Untersuchungen mit isolierten biologischen Probenmaterialien verschiedenen Ursprungs durchgeführt werden. Hierbei ist Voraussetzung, daß die verschiedenen isolierten biologischen Probenmaterialien nach der Isolation unter standardisierten Bedingungen aufbereitet, konserviert und gelagert werden.

Es besteht mithin ein Bedarf an einem Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von biologischem Probenmaterial.

Des weiteren besteht ein Bedarf an einer Sammlung von biologischem

5 Probenmaterial, das den biochemischen Zustand in seiner natürlichen Umgebung zuverlässiger wiedergibt.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von isoliertem biologischen Probenmaterial, wobei isoliertes

10 biologisches Probenmaterial innerhalb eines definierten Zeitraums nach Isolation des Probenmaterials aus seiner natürlichen Umgebung konserviert und nachfolgend gelagert wird und wobei der definierte Zeitraum zwischen Isolation und Konservierung verschiedener Probenmaterialien eine definierte maximale Abweichung aufweist, gelöst.

15

Bevorzugte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind in den Unteransprüchen 2 bis 15 angegeben.

20 Die Aufgabe wird weiterhin durch eine Probensammlung, die isoliertes und gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 aufbereitetes biologisches Probenmaterial enthält, gelöst.

25 Die Entnahme bzw. Isolation des biologischen Probenmaterials aus seiner natürlichen Umgebung, beispielsweise durch chirurgischen Eingriff beim Menschen, ist nicht Gegenstand der Erfindung. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erstellung einer Probensammlung aus isoliertem biologischen Probenmaterial folgt unmittelbar auf die Entnahme und kann von Laborpersonal ohne ärztliche Beaufsichtigung durchgeführt werden.

30 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird die Beschaffenheit des biologischen Probenmaterials nach der Isolation aus seiner natürlichen Umgebung und vor der Konservierung erfaßt und dokumentiert.

35 Die Erfassung der Beschaffenheit des isolierten biologischen Probenmaterials kann beispielsweise durch fotografische Dokumentation erfolgen. Des weiteren kann eine

medizinische oder wissenschaftliche Begutachtung und Bewertung des Zustands des isolierten biologischen Probenmaterials und Dokumentation der Bewertung erfolgen.

Eine Erfassung der Beschaffenheit des biologischen Probenmaterials unmittelbar nach der Isolation aus seiner natürlichen Umgebung erlaubt eine umfassendere

5 Beurteilung und Bewertung von zu einem späteren Zeitpunkt mit dem isolierten biologischen Probenmaterial durchgeführten Untersuchungen und/oder Experimenten.

Vorzugsweise weist das biologische Probenmaterial ein definiertes Volumen auf.

10 Hierbei hat sich ein Volumen von etwa $0,5 \text{ cm}^3$ bis etwa 1 cm^3 als sehr geeignet erwiesen. Dabei ist es bevorzugt, mehrere biologische Probenmaterialien zu gewinnen, die in etwa das gleiche Volumen, beispielsweise etwa $0,5 \text{ cm}^3$ und/oder etwa 1 cm^3 aufweisen. Selbstverständlich kann das biologische Probenmaterial auch kleinere Volumina, beispielsweise 1 mm^3 oder 3 mm^3 , oder auch größere Volumina, 15 beispielsweise 2 cm^3 oder 4 cm^3 , einnehmen.

Das biologische Probenmaterial kann unmittelbar nach der Isolation aus seiner natürlichen Umgebung und Erfassung der Beschaffenheit, beispielsweise durch digitale Photodokumentation, auf das gewünschte Probenvolumen mit einem Skalpell

20 zugeschnitten werden. Nachfolgend können die Probenvolumina in geeignete Probenröhrchen, beispielsweise Kryoröhrchen, überführt werden. Die Kryoröhrchen können nachfolgend in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Die isolierten biologischen Probenmaterialien können auch in Paraffin eingebettet

25 werden. Vor der Paraffineinbettung kann gegebenenfalls eine Entwässerung unter standardisierten Bedingungen erfolgen. Aus den eingebetteten Probenmaterialien können beispielsweise Gewebeschnitte für eine mikroskopische Untersuchung angefertigt werden.

30 Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung beträgt die definierte maximale Abweichung des definierten Zeitraums nicht mehr als etwa 10 %, vorzugsweise nicht mehr als etwa 5 %, bezogen auf den definierten Zeitraum.

35 Es hat sich gezeigt, daß die Einhaltung eines definierten Zeitraumes, gemessen von der Entnahme des biologischen Probenmaterials bis zur Konservierung und/oder

Lagerung des isolierten biologischen Probenmaterials, die Vergleichbarkeit der Qualität des isolierten biologischen Probenmaterials stark verbessert.

Bei Einhaltung standardisierter Bedingungen bei der Aufarbeitung der isolierten

5 biologischen Probenmaterialien, insbesondere der Zeitdauer zwischen Entnahme und Konservierung und/oder Lagerung, weisen die gesammelten biologischen Probenmaterialien eine sehr gute Vergleichbarkeit auf.

Mithin können bei einem Vergleich des biochemischen und/oder physiologischen

10 Zustandes der isolierten biologischen Probenmaterialien von beispielsweise gesunden bzw. nichtpathologischen Gewebeproben mit pathologischen Gewebeproben die Unterschiede auf die jeweilige Erkrankung oder Entartung zurückgeführt werden. Das heißt, bei einer standardisierten Aufarbeitung der isolierten biologischen Probenmaterialien sind die gegebenenfalls zwischen 15 verschiedenen biologischen Probenmaterialien festzustellenden Unterschiede nicht auf das jeweilige Aufarbeitungsverfahren bzw. eine unterschiedliche Zeitdauer der Aufarbeitung zurückzuführen, sondern ein Indiz für die molekularen Ursachen der jeweiligen Erkrankung oder Entartung.

20 Erfindungsgemäß ist bevorzugt, daß der definierte Zeitraum weniger als etwa 25 Minuten, vorzugsweise weniger als etwa 15 Minuten, beträgt. Weiterhin ist bevorzugt, daß der definierte Zeitraum etwa 12 Minuten beträgt. Noch bevorzugter beträgt der definierte Zeitraum etwa 10 Minuten. Selbstverständlich kann der definierte Zeitraum auch kürzer sein, beispielsweise 5 oder 8 Minuten.

25 Im Hinblick auf den Umstand, daß die Isolation von humanem biologischen Probenmaterial in einem Operationssaal zu erfolgen hat und die Aufarbeitung des isolierten biologischen Probenmaterials regelmäßig außerhalb des Operationssaals erfolgt, ist eine Verringerung der Zeitdauer, gemessen ab Isolation des biologischen 30 Probenmaterials bis zur Konservierung des isolierten biologischen Probenmaterials, von weniger als fünf Minuten praktisch nicht durchführbar. Als sehr geeignet hat sich ein definierter Zeitraum von etwa 10 Minuten erwiesen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Weiterbildung erfolgt die Konservierung des isolierten biologischen Probenmaterials durch Kryokonservierung oder durch chemische Konservierung.

5 Unter „Konservierung“ wird im Sinne der Erfindung verstanden, daß der biochemische oder physiologische Zustand des isolierten biologischen Probenmaterials fixiert wird.

Die Kryokonservierung erfolgt vorzugsweise durch Eintauchen des isolierten
10 biologischen Probenmaterials in ein Kältemedium und Einfrieren des biologischen Probenmaterials in einem Zeitraum von vorzugsweise wenigen Sekunden. Als Kältemedium wird vorzugsweise flüssiger Stickstoff verwendet. Bei dieser Vorgehensweise fallen die Konservierung und Lagerung des isolierten biologischen Probenmaterials zusammen.

15 Gemäß einer weiteren Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Konservierung unter Verwendung von chemischem Vernetzungsmittel. Die bevorzugt verwendeten Vernetzungsmittel besitzen reaktive Gruppen.

20 Unter „reaktiven Gruppen“ werden im Sinne der Erfindung chemische Funktionalitäten verstanden, die sich mit dem isolierten biologischen Probenmaterial chemisch umsetzen. Dabei können die reaktiven Gruppen des Vernetzungsmittels mit reaktiven Gruppen auf dem isolierten biologischen Probenmaterial reagieren. Vorzugsweise enthält das bei der Erfindung verwendete Vernetzungsmittel als
25 reaktive Gruppen Aldehyd- und/oder Epoxidgruppen, die sich vorzugsweise mit Aminogruppen auf dem isolierten biologischen Probenmaterial umsetzen.

Die Vernetzungsmittel werden dabei vorzugsweise aus der Gruppe ausgewählt, die aus Formaldehyd, Polyaldehyden, vorzugsweise Dialdehyden, Polyepoxid-
30 verbindungen, vorzugsweise Di- und/oder Triepoxidverbindungen, und/oder Gemischen davon besteht.

Vorzugsweise wird als Dialdehyd Glutardialdehyd verwendet. Anstelle von Formaldehyd kann selbstverständlich auch Paraformaldehyd verwendet werden.

Als Diepoxidverbindungen können beispielsweise Polyalkylenglykoldiglycidylether, vorzugsweise Polyethylenglykoldiglycidylether, oder Alkandiolglycidylether, beispielsweise 1,6-Hexandiolglycidylether und/oder 1,4-Butandiolgylcidylether, verwendet werden.

5

Als Polyglycidylverbindungen können beispielsweise Polyalkoholpolyglycidylether, beispielsweise Sorbitolpolyglycidylether, Glycerinpolyglycidylether, Pentaerythrolpolyglycidylether, Saccharidpolyglycidylether und Gemische davon verwendet werden.

10

Das isolierte biologische Probenmaterial kann nur durch Kryobehandlung oder nur durch chemische Konservierung konserviert werden. Selbstverständlich kann das isolierte biologische Probenmaterial zunächst mit chemischem Vernetzungsmittel oder Konservierungsmittel behandelt und nachfolgend einer Kryobehandlung 15 unterworfen werden. Es ist aber auch möglich, das isolierte biologische Probenmaterial zunächst einer Kryobehandlung und Lagerung unter flüssigem Stickstoff oder in einem Gefrierschrank, beispielsweise bei -80°C, zu lagern und zu einem späteren Zeitpunkt einer chemischen Konservierung durch Behandlung mit chemischem Vernetzungsmittel oder Konservierungsmittel zu unterwerfen.

20

Bevorzugt ist das isolierte biologische Probenmaterial humanes Gewebe. Das bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendete biologische Probenmaterial kann grundsätzlich jedes biologische Material sein, mit dem eine Sammlung mit isoliertem biologischen Probenmaterial erstellt werden soll.

25

Besonders eignet sich tumorfreies Gewebe, Tumorgewebe und/oder Fettgewebe bei dem erfindungsgemäßen Verfahren. Des weiteren ist bevorzugt, daß das Tumorgewebe zentrales oder peripheres Tumorgewebe ist. Als Tumorgewebe kann beispielsweise Gewebe von Kolonkarzinom, Rektumkarzinom, Pankreaskarzinom, 30 Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Bronchialkarzinom, Magenkarzinom oder Cervixkarzinom verwendet werden.

Der Vergleich des biochemischen und/oder physiologischen Zustandes von tumorfreiem Gewebe, zentralem sowie peripherem Tumorgewebe aus der erfindungsgemäßen Probensammlung bzw. nach dem erfindungsgemäßen

Verfahren aufbereitete isolierte biologische Probenmaterialien kann die molekularen Unterschiede, beispielsweise von Genaktivitäten, Expressionsmustern, Expressionsprofilen, aktivierten Proteinen, insbesondere zellulären Tumorfaktoren, Enzymen, etc., bei experimentellen Untersuchungen aufzeigen.

5

Die unterschiedlichen DNA-, RNA- und/oder Protein-Aktivitäten in den isolierten biologischen Proteinmaterialien können beispielsweise in Microarray-Analysen, beispielsweise auf sogenannten Biochips (DNA-Arrays oder Protein-Arrays), untersucht werden.

10

Aus diesem Vergleich von unter standardisierten Bedingungen aufbereitetem biologischen Probenmaterial lassen sich mögliche Angriffspunkte für Wirkstoffe und/oder Arzneimittel bei der Behandlung von Krebs oder Stoffwechselerkrankungen ermitteln. Insbesondere ist unter Verwendung einer Vielzahl von nach dem

15

erfindungsgemäßen Verfahren aufbereiteten isolierten biologischen Probenmaterialien eine statistische Validierung der experimentellen Ergebnisse möglich.

20

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung werden dem isolierten biologischen Probenmaterial Datensätze zugeordnet.

25

Die Datensätze enthalten insbesondere Informationen über die isolierten Probenmaterialien. In der Regel wird das isolierte biologische Probenmaterial vor oder nach der Konservierung mehrfach geteilt und separat voneinander aufbewahrt.

30

Ein Teil des Probenmaterials kann dann unter Verwendung molekularbiologischer Verfahren, beispielsweise auf Proteinebene und/oder mRNA-Ebene, analysiert werden. Diese Daten erlauben eine Aussage über den Aktivierungs- bzw. Inaktivierungszustand von Genen, mRNAs und/oder Proteinen. Unter Verwendung dieser Daten kann mithin eine Art Aktivierungsprofil oder Expressionsprofil des isolierten biologischen Probenmaterials erstellt werden.

35

Die Zuordnung der Datensätze zu den isolierten biologischen Probenmaterialien kann beispielsweise über Identifikationsnummern des jeweiligen isolierten biologischen Probenmaterials in einer Computer-gestützten Datenbank erfolgen.

Vorzugsweise umfassen die Datensätze ferner Informationen über die Anamnese, Medikation, Narkose, den Operationsverlauf, klinische Parameter und/oder Nachsorgedaten.

5 Die Datensätze enthalten vorzugsweise zusätzlich Informationen über klinisch-chemische Diagnosen von Blut-, Stuhl-, Urin-, Sputum-, Liquor cerebrospinalis-Proben, etc., die vor und/oder nach Isolation des jeweiligen biologischen Probenmaterials vom Patienten gewonnen wurden. Somit können die Datensätze Informationen über Blutgruppe, Blutbild, Gerinnungswerte, Tumormarker,

10 Leberwerte, Nierenwerte, Serum-Elektrolytwerte, etc. enthalten.

Des weiteren können die Datensätze Informationen über vor und/oder nach der Isolation von biologischem Probenmaterial dem Patienten verabreichte Medikamente enthalten.

15 Ebenfalls können die Datensätze Informationen bzgl. der Anamnese, beispielsweise Eß- und Lebensgewohnheiten wie Appetit, Aversionen, Allergien, Vorerkrankungen, Kindererkrankungen, Infektionserkrankungen, Tropenerkrankungen, frühere Krebserkrankungen, Schlafgewohnheiten, Ausscheidungsgewohnheiten von Stuhl

20 und Urin, Alkohol-, Nikotin- und/oder Drogenkonsum, Beschwerden und Befindlichkeiten, Symptome, Medikamentendosen und Unverträglichkeiten von Medikamenten, etc., umfassen.

25 Des weiteren können die Datensätze Informationen über den zeitlichen Verlauf der Entnahme des biologischen Probenmaterials aus seiner natürlichen Umgebung umfassen. Vorzugsweise wird als Beginn des zeitlichen Ablaufs die Abtrennung bzw. Herauslösung des Gewebes von Menschen verwendet. Bei Isolation von Kolongewebeproben ist der Zeitpunkt der Durchtrennung des proximalen und distalen Endes des biologischen Probenmaterials der Startpunkt der Zeitmessung.

30 Insbesondere können weitere Informationen bzgl. des isolierten biologischen Probenmaterials dokumentiert werden, beispielsweise Angaben zu Größe des isolierten Gewebematerials, beispielsweise die Tumogröße.

Die isolierten biologischen Probenmaterialien können dann, wie oben erläutert, durch Kryobehandlung beispielsweise in flüssigem Stickstoff konserviert und unter flüssigem Stickstoff oder in einem Gefrierschrank, beispielsweise bei etwa -80°C, aufbewahrt werden.

5

Die isolierten biologischen Probenmaterialien können aber auch zunächst chemisch konserviert oder fixiert und, falls erwünscht, nachfolgend einer Kryobehandlung, beispielsweise durch Behandlung mit flüssigem Stickstoff, unterworfen werden und schließlich bis zur weiteren Verwendung beispielsweise unter flüssigem Stickstoff

10 oder in einem Gefrierschrank, beispielsweise bei etwa -80°C, aufbewahrt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Erstellung einer Sammlung von isoliertem biologischen Probenmaterial, das unter standardisierten Bedingungen aufgearbeitet wurde, wobei jedem isolierten biologischen Probenmaterial eine

15 Vielzahl von klinisch relevanten Daten zugeordnet werden kann. Die Kombination von standardisiertem Probenmaterial und klinisch relevanten Daten ist äußerst wertvoll für die Wirkstoff- oder Arzneimittelforschung.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Probensammlung mehr als 100,

20 vorzugsweise mehr als 500, noch bevorzugter mehr als 1000 isolierte biologische Probenmaterialien.

Beispiel 1: Erstellung einer Sammlung von isoliertem Colongewebe

25 Nachfolgend wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von isoliertem biologischen Probenmaterial anhand von isoliertem Colontumorgewebe veranschaulicht. Das erfindungsgemäße Verfahren ist jedoch nicht auf Colontumorgewebe bzw. Colongewebe beschränkt und kann selbstverständlich auch mit anderem Körpergewebe, beispielsweise Bronchialgewebe, Mammagewebe, etc., durchgeführt werden.

Zur Erstellung von dem isolierten biologischen Probenmaterial zugeordneten Datensätzen wurden neben den Anamnesedaten sowie weiteren klinisch-chemischen Parametern des Patienten, beispielsweise Blut-, Urin-, Liquor-, Sputumanalysen, etc., auch der zeitliche Ablauf bis zur und einschließlich der

35

Entnahme des biologischen Probenmaterials dokumentiert. Mithin wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren unter standardisierten Bedingungen gewonnenes Probenmaterial zur Erstellung einer Probensammlung bereitgestellt. Darüber hinaus wird vorzugsweise eine Vielzahl klinisch relevanter Informationen über den

5 Patienten, dem das Probenmaterial entnommen wurde, sowie über die Gewinnung des Probenmaterials selbst als auch Analysedaten des isolierten Probenmaterials in Form von Datensätzen dem isolierten biologischen Probenmaterial zugeordnet und gespeichert.

10 Mithin stehen beispielsweise der Wirkstoff- bzw. Arzneimittelforschung zum einem eine Vielzahl von innerhalb einer äußerst kurzen Zeit, beispielsweise 10 Minuten, und unter standardisierten Bedingungen gewonnene biologische Probenmaterialien sowie zum anderen mit dem jeweiligen Probenmaterial verknüpfte spezifische Informationen zur Verfügung.

15 Die bei der Wirkstoffforschung mit verschiedenen isolierten Gewebeproben, beispielsweise Colongewebeproben, erhaltenen gegebenenfalls unterschiedlichen Ergebnisse können eventuell vor dem Hintergrund der weiter vorliegenden Informationen verstanden, erklärt und/oder gedeutet werden. Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erstellte erfindungsgemäße Proben- und
20 Datensammlung ist insbesondere für die Wirkstoffforschung der Pharmaindustrie ein äußerst wertvolles Werkzeug.

Den Zeitpunkten vor der Isolation des Probenmaterials ist in der untenstehenden
25 Tabelle 1 ein Minuszeichen vorangestellt. Die Entnahme selbst ist nicht Teil des erfindungsgemäßen Verfahrens. Vielmehr beginnt das erfindungsgemäße Verfahren unmittelbar nach der erfolgten Isolation des biologischen Probenmaterials. Den Zeitpunkt nach der erfolgten Isolation ist in der Tabelle 1 ein Pluszeichen vorangestellt.

Tabelle1: Zeitverlauf von der Entnahme bis zur Konservierung von Colongewebe

Zeitpunkt	Handlung
5	
-77 min	Beginn der Narkose des Patienten
-61 min	Blutabnahme
-45 min	Beginn der Operation
-38 min	Urinabnahme
10	
-14 min	Abbindung der Mesenterica inferior
- 7 min	Abbindung der unteren Arkade
- 5 min	Abbindung der oberen Arkade
- 3 min	Durchtrennung des distalen Endes des Resektats (Colongewebe)
0 min	nach Durchtrennung des proximalen Endes des Resektats
15	
+ 1 min	Resektat wird entlang des Darmverlaufs mit einer Schere aufgeschnitten, wobei der Tumor vorzugsweise nicht durchschnitten wird.
+1 bis 5 min	Das Resektat sowie der Tumor werden vorzugsweise mit einer digitalen Kamera photographiert. Von dem Tumor wird eine Großaufnahme angefertigt.
20	
+ 5 min	Aus dem Resektat und dem Tumor werden Proben entnommen. Die Proben umfassen beispielsweise gesundes Gewebe, Fettgewebe, peripheres Tumorgewebe und zentrales Tumorgewebe. Das gesunde Gewebe wird mindestens 5 cm von dem Tumor entfernt aus dem Resektat entnommen. Die Proben werden zerteilt, so daß das Volumen vorzugsweise etwa $0,5 \text{ cm}^3$ beträgt. Die zerteilten Proben werden in Probenröhrchen überführt
25	
+ 10 min	Konservierung der Probenmaterialien in den Röhrchen: - durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff oder
30	- durch Zugabe von 10 ml 3,5 % Formaldehydlösung oder - durch Zugabe von 10 ml 5,5 Gew.-% Glutaraldehydlösung
35	Von den durch Zerteilung der isolierten Probenmaterialien erhaltenen Proben wird vorzugsweise jeweils ein Drittel nach jedem der vorstehenden Konservierungsverfahren konserviert und nachfolgend

gelagert. Bei Konservierung mittels Formaldehyd oder Glutaraldehyd wird das biologische Probenmaterial vorzugsweise über einen definierten Zeitraum, beispielsweise zehn oder 24 Stunden, bei Zimmertemperatur (z.B. 25°C) stehen gelassen. Mit Zugabe der Konservierungslösung, d.h. Formaldehydlösung, Glutaraldehydlösung oder flüssigem Stickstoff, ist das erfindungsgemäße Verfahren in zeitlicher Hinsicht abgeschlossen.

5 Beispiel 2: Nachweis der Veränderung von biologischem Probenmaterial über die
10 Zeit Isolation aus der natürlichen Umgebung

Als Nachweis für die Bedeutung des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde die Protein Zusammensetzung von Darmgewebeproben in definierten zeitlichen Abständen nach Entnahme aus dem Patienten mittels SELDI-MS (Surface-enhanced 15 Laser Desorption Ionisation-Massenspektrometrie) untersucht.

In Fig. 1 ist das Ergebnis von SELDI-MS-Analysen von Dickdarmgewebeproben gezeigt. Das Probenmaterial wurde dabei 3 min, 5 min, 8 min, 10 min, 15 min, 20 min sowie 30 min nach Entnahme aus dem Patienten in flüssigem Stickstoff eingefroren. 20 Die Proben wurden nachfolgend gemäß Herstellerangaben (Firma CIPHERGEN, Göttingen, Deutschland) aufgearbeitet und mittels SELDI-MS analysiert.

In Fig. 1 ist das jeweils erhaltene Massenspektrum gezeigt. Von dem in der rechten Eingrenzung gezeigten Teil des Massenspektrums ist eine vergrößerte Überlagerung 25 der Massenspektren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Entnahme rechts von den Massenspektren dargestellt. In der Überlagerung des Ausschnitts der erhaltenen Massenspektren sind die jeweiligen Zeitpunkte des Einfrierens des Probenmaterials in flüssigem Stickstoff angegeben.

30 Es ist deutlich zu erkennen, dass es zu einer zeitlichen Veränderung bei der Protein Zusammensetzung bei den isolierten Resektaten, den isolierten Colongewebeproben, zwischen Resektion und Einfrieren innerhalb von Minuten kommt. Die zeitliche Veränderung kann beispielsweise auf eine Hoch- und/oder 35 Unterregulierung von Proteinen, beispielsweise infolge einer Unterversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) zurückzuführen sein.

Diese Ergebnisse belegen die große Bedeutung des erfindungsgemäßen Verfahrens, nämlich der Standardisierung der Aufarbeitung der isolierten biologischen Probenmaterialien, bei der Erstellung einer Sammlung von 5 biologischem Probenmaterial.

Patentansprüche

10 1. Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von isoliertem biologischem Probenmaterial, wobei isoliertes biologisches Probenmaterial innerhalb eines definierten Zeitraums nach Isolation des Probenmaterials aus seiner natürlichen Umgebung konserviert und nachfolgend gelagert wird und wobei der definierte Zeitraum zwischen Isolation und Konservierung verschiedener Probenmaterialien eine definierte maximale Abweichung aufweist.

15 2. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Beschaffenheit des biologischen Probenmaterials nach der Isolation aus seiner natürlichen Umgebung und vor der Konservierung erfaßt und dokumentiert wird.

20 3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß das biologische Probenmaterial ein definiertes Volumen aufweist.

25 4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß die definierte maximale Abweichung des definierten Zeitraums nicht mehr als etwa 10 %, vorzugsweise nicht mehr als etwa 5 %, bezogen auf den definierten Zeitraum, beträgt.

30 5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,

daß der definierte Zeitraum weniger als etwa 25 Minuten, vorzugsweise weniger als etwa 15 Minuten, beträgt.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5,

dadurch gekennzeichnet,

daß der definierte Zeitraum etwa 12 Minuten beträgt.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5,

dadurch gekennzeichnet,

daß der definierte Zeitraum etwa 10 Minuten beträgt.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Konservierung durch Kryokonservierung oder durch chemische Konservierung erfolgt.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8,

dadurch gekennzeichnet,

daß bei der chemischen Konservierung Vernetzungsmittel mit reaktiven Gruppen verwendet werden.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Vernetzungsmittel aus der Gruppe ausgewählt werden, die aus Formaldehyd, Polyaldehyden, vorzugsweise Dialdehyden, Polyepoxidverbindungen, vorzugsweise Di- und/oder Triepoxidverbindungen, und/oder Gemischen davon besteht.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10,

dadurch gekennzeichnet,

daß das isolierte biologische Probenmaterial humanes Gewebe ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11,

dadurch gekennzeichnet,

daß das humane Gewebe tumorfreies Gewebe, Tumorgewebe und/oder Fettgewebe ist.

13. Verfahren gemäß Anspruch 12,

5 **dadurch gekennzeichnet,**

daß das Tumorgewebe zentrales oder peripheres Tumorgewebe ist.

14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13,

10 **dadurch gekennzeichnet,**

daß dem Probenmaterial Datensätze zugeordnet werden.

15. Verfahren gemäß Anspruch 14,

15 **dadurch gekennzeichnet,**

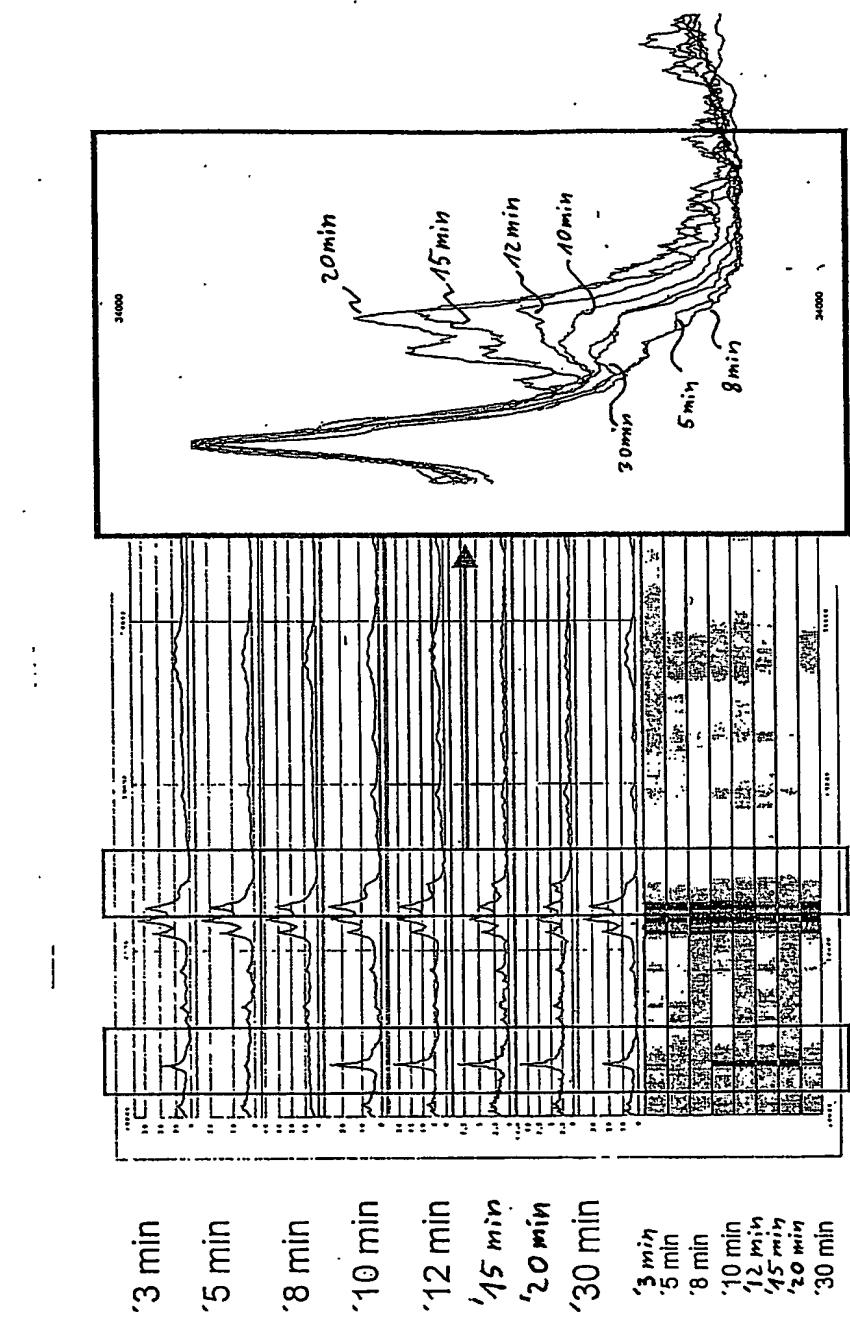
daß die Datensätze Informationen über die Anamnese, Medikation,

Narkose, Operationsverlauf, klinische Parameter und/oder

Nachsorgedaten umfassen.

16. Biologische Probenmaterial-Sammlung, die isoliertes und gemäß dem

20 Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 aufbereitetes biologisches Probenmaterial enthält.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/04217

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 747 265 A (RUGG ARTHUR E ET AL) 5 May 1998 (1998-05-05) column 1, line 54 – line 56; claim 1 ----	1-10
X	US 5 753 444 A (COOMBS JANA ET AL) 19 May 1998 (1998-05-19) column 9, line 45 – line 50; example 1 ----	1-10
X	US 2002/102570 A1 (BAKER TONY) 1 August 2002 (2002-08-01) paragraph '0010!; figures 1-18 ----	1-10
X	WO 87/06621 A (GILLESPIE DAVID) 5 November 1987 (1987-11-05) page 7 ----	1-10 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

20 April 2004

13/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/04217

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/37119 A (MANSON JEAN CATHERINE ;ROSLIN INST EDINBURGH (GB); CLINTON MICHAEL) 10 May 2002 (2002-05-10) page 28, line 29 -page 29, line 29; figure 10 -----	1-10
A	WO 01/49881 A (BREM GOTTFRIED ;AGROBIOGEN GMBH BIOTECHNOLOGIE (DE)) 12 July 2001 (2001-07-12) claims 1-10; figure 1 page 6, line 8-13 -----	1-10
A	KONONEN ET AL: "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumour specimens" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 4, no. 7, July 1998 (1998-07), pages 844-847, XP002160224 ISSN: 1078-8956 abstract; figures 1,2 -----	1-10
A	EP 1 054 059 A (VLAAMS INTERUNIV INST BIOTECH) 22 November 2000 (2000-11-22) page 9, paragraph 50 page 4, paragraph 20 page 12, paragraph 72 -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/04217

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5747265	A 05-05-1998	AU 678260 B2 AU 7017794 A CA 2161650 A1 CN 1122614 A EP 0698125 A1 JP 8506421 T WO 9426935 A1 AU 686577 B2 AU 5457194 A CA 2148219 A1 EP 0666987 A1 JP 7509783 T WO 9410571 A1		22-05-1997 12-12-1994 24-11-1994 15-05-1996 28-02-1996 09-07-1996 24-11-1994 12-02-1998 24-05-1994 11-05-1994 16-08-1995 26-10-1995 11-05-1994
US 5753444	A 19-05-1998	US 5612473 A EP 0785279 A1 JP 9313181 A US 5738995 A US 5756701 A US 5846783 A		18-03-1997 23-07-1997 09-12-1997 14-04-1998 26-05-1998 08-12-1998
US 2002102570	A1 01-08-2002	US 2002037512 A1 US 2002102580 A1 AU 1719699 A CA 2313654 A1 EP 1038028 A2 JP 2001526051 T WO 9929904 A2		28-03-2002 01-08-2002 28-06-1999 17-06-1999 27-09-2000 18-12-2001 17-06-1999
WO 8706621	A 05-11-1987	AT 114334 T AU 613870 B2 AU 7432987 A CA 1301606 C DE 3750774 D1 DE 3750774 T2 EP 0305399 A1 JP 2552691 B2 JP 1502317 T US 5482834 A WO 8706621 A1		15-12-1994 15-08-1991 24-11-1987 26-05-1992 05-01-1995 27-04-1995 08-03-1989 13-11-1996 17-08-1989 09-01-1996 05-11-1987
WO 0237119	A 10-05-2002	AU 1074002 A BR 0115090 A CA 2427004 A1 CN 1473272 T EP 1348128 A2 WO 0237119 A2 NO 20031941 A US 2002164661 A1		15-05-2002 07-10-2003 10-05-2002 04-02-2004 01-10-2003 10-05-2002 27-06-2003 07-11-2002
WO 0149881	A 12-07-2001	DE 10000001 A1 AU 2677101 A CA 2395916 A1 WO 0149881 A2 EP 1242632 A2 US 2003104425 A1		19-07-2001 16-07-2001 12-07-2001 12-07-2001 25-09-2002 05-06-2003
EP 1054059	A 22-11-2000	EP 1054059 A1		22-11-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen
PCT/DE 03/04217

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 747 265 A (RUGG ARTHUR E ET AL) 5. Mai 1998 (1998-05-05) Spalte 1, Zeile 54 – Zeile 56; Anspruch 1 ---	1-10
X	US 5 753 444 A (COOMBS JANA ET AL) 19. Mai 1998 (1998-05-19) Spalte 9, Zeile 45 – Zeile 50; Beispiel 1 ---	1-10
X	US 2002/102570 A1 (BAKER TONY) 1. August 2002 (2002-08-01) Absatz '0010!; Abbildungen 1-18 ---	1-10
X	WO 87/06621 A (GILLESPIE DAVID) 5. November 1987 (1987-11-05) Seite 7 ---	1-10 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

20. April 2004

13/05/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL – 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van Klompenburg, W

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen
PCT/DE 03/04217

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 02/37119 A (MANSON JEAN CATHERINE ; ROSLIN INST EDINBURGH (GB); CLINTON MICHAEL) 10. Mai 2002 (2002-05-10) Seite 28, Zeile 29 -Seite 29, Zeile 29; Abbildung 10 ---	1-10
A	WO 01/49881 A (BREM GOTTFRIED ; AGROBIOGEN GMBH BIOTECHNOLOGIE (DE)) 12. Juli 2001 (2001-07-12) Ansprüche 1-10; Abbildung 1 Seite 6, Zeile 8-13 ---	1-10
A	KONONEN ET AL: "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumour specimens" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, Bd. 4, Nr. 7, Juli 1998 (1998-07), Seiten 844-847, XP002160224 ISSN: 1078-8956 Zusammenfassung; Abbildungen 1,2 -----	1-10
A	EP 1 054 059 A (VLAAMS INTERUNIV INST BIOTECH) 22. November 2000 (2000-11-22) Seite 9, Absatz 50 Seite 4, Absatz 20 Seite 12, Absatz 72 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/04217

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5747265	A	05-05-1998	AU	678260 B2	22-05-1997
			AU	7017794 A	12-12-1994
			CA	2161650 A1	24-11-1994
			CN	1122614 A	15-05-1996
			EP	0698125 A1	28-02-1996
			JP	8506421 T	09-07-1996
			WO	9426935 A1	24-11-1994
			AU	686577 B2	12-02-1998
			AU	5457194 A	24-05-1994
			CA	2148219 A1	11-05-1994
			EP	0666987 A1	16-08-1995
			JP	7509783 T	26-10-1995
			WO	9410571 A1	11-05-1994
US 5753444	A	19-05-1998	US	5612473 A	18-03-1997
			EP	0785279 A1	23-07-1997
			JP	9313181 A	09-12-1997
			US	5738995 A	14-04-1998
			US	5756701 A	26-05-1998
			US	5846783 A	08-12-1998
US 2002102570	A1	01-08-2002	US	2002037512 A1	28-03-2002
			US	2002102580 A1	01-08-2002
			AU	1719699 A	28-06-1999
			CA	2313654 A1	17-06-1999
			EP	1038028 A2	27-09-2000
			JP	2001526051 T	18-12-2001
			WO	9929904 A2	17-06-1999
WO 8706621	A	05-11-1987	AT	114334 T	15-12-1994
			AU	613870 B2	15-08-1991
			AU	7432987 A	24-11-1987
			CA	1301606 C	26-05-1992
			DE	3750774 D1	05-01-1995
			DE	3750774 T2	27-04-1995
			EP	0305399 A1	08-03-1989
			JP	2552691 B2	13-11-1996
			JP	1502317 T	17-08-1989
			US	5482834 A	09-01-1996
			WO	8706621 A1	05-11-1987
WO 0237119	A	10-05-2002	AU	1074002 A	15-05-2002
			BR	0115090 A	07-10-2003
			CA	2427004 A1	10-05-2002
			CN	1473272 T	04-02-2004
			EP	1348128 A2	01-10-2003
			WO	0237119 A2	10-05-2002
			NO	20031941 A	27-06-2003
			US	2002164661 A1	07-11-2002
WO 0149881	A	12-07-2001	DE	10000001 A1	19-07-2001
			AU	2677101 A	16-07-2001
			CA	2395916 A1	12-07-2001
			WO	0149881 A2	12-07-2001
			EP	1242632 A2	25-09-2002
			US	2003104425 A1	05-06-2003
EP 1054059	A	22-11-2000	EP	1054059 A1	22-11-2000